

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 545–548

Eine einfache Extraktionskammer zur gaschromatographischen Gasanalyse in kleinen Blutproben (50 µl)

Von H. Schachinger

Aus dem Physiologischen Institut der Medizinischen Hochschule Hannover

(Eingegangen am 24. April/15. Juli 1975)

Zusammenfassung: Eine einfache Extraktionskammer zur gaschromatographischen Messung der O_2 -, CO_2 - und N_2O -Konzentration in 50 µl Blutproben wird beschrieben, welche aus dem Ohrläppchen eines Patienten bzw. eines Probanden durch einen Arzt oder eine medizinische Hilfsperson überführt werden können. Es wird gezeigt, daß N_2O , O_2 und CO_2 quantitativ aus Blut bzw. Erythrocytensuspensionen bzw. HCO_3^- -Lösungen extrahiert werden. Der Variationskoeffizient der Konzentrationsbestimmungen bei Injektion gleicher Flüssigkeits-Proben beträgt 1,3 % für O_2 und N_2O und 1,2 % für CO_2 .

A simple extraction chamber for the analysis of gases by gas chromatography in small blood samples (50 µl)

Summary: A sample extraction chamber for the determination of O_2 -, CO_2 - and N_2O -concentrations in 50 µl blood samples by gas chromatography is described. These blood samples can be transferred anaerobically from the ear lobe of a patient or other donor by a doctor or medical auxiliary. It is shown that N_2O , O_2 , and CO_2 are completely extracted from blood, red cell suspension and HCO_3^- -solutions respectively. When the concentrations of the same sample was repeatedly measured the coefficient of variation was 1.3 % for O_2 and N_2O and 1.2 % for CO_2 .

Die Gaschromatographie erlaubt bei Verwendung geeigneter Säulenkombinationen die Trennung und quantitative Bestimmung von Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxid, Kohlenmonoxid, Stickoxydul und weiterer inerten Gase wie z. B. Argon, Helium, Neon oder Xenon. Die Methode wurde erstmals 1961 von Muysers et al. (1) und Wilson et al. (2) zur Blutgasanalyse eingesetzt. Hierbei erwies sich die Extraktion der Gase aus dem Blut und die Injektion in den Trägergasstrom als zentrales technisches Problem.

Muysers et al (1) sowie Albers & Farhi (3) extrahierten die Blutgase mit einem modifizierten manometrischen Apparat nach van Slyke & Neill (4) und überführten die Gase über eine Hahnbohrung in den Trägergasstrom (Methode der Vakuumextraktion). Albers & Farhi (3) gelang es, die O_2 -Konzentration von 500 µl-Blutproben mit einer ausgezeichneten Reproduzierbarkeit (der Variationskoeffizient betrug 0,7 %) bei einer Analysenzeit von 5 min zu messen. Da jedoch die für die Vakuumextraktion erforderliche Apparatur umfangreich ist und die so durchgeführte Analyse von O_2 und CO_2 gegenüber der manometrischen nach van Slyke & Neill (4) keine wesentliche Vereinfachung darzustellen scheint, wurde

versucht, die Gase durch den Trägergasstrom selbst aus den Blutproben zu extrahieren (Auswaschmethode nach Wilson, (2)). Hierzu wurden Kammern gebaut, welche die Einführung der Blutproben sowie der Reagenzien zur Freisetzung der gebundenen Gase erlauben und die mit Trägergasstrom durchspült werden können.

Es erschien wünschenswert, eine Methode zur Verfügung zu haben, welche die Analyse in kleineren Blutproben (50 µl) nach dem Auswaschverfahren erlaubt. Arterielle Blutproben dieser Größe können ohne größeren Eingriff aus dem Ohrläppchen gewonnen werden (5). Für die Analyse solcher kleiner Blutproben ist jedoch eine hochgradige Luftdichtigkeit der Extraktionskammern erforderlich. Im folgenden soll eine Extraktionskammer beschrieben werden, welche die Anforderungen an die Dichtigkeit erfüllt und sich durch Einfachheit auszeichnet.

Beschreibung der Apparatur und des Meßverfahrens

Die Extraktionskammer (Abb. 1) ist ein U-förmig gebogenes Glasrohr, welches über Schraubverschüsse (Swagelok fittings) und Silikon-O-Ringe gasdicht an die Stahlansatzstutzen kom-

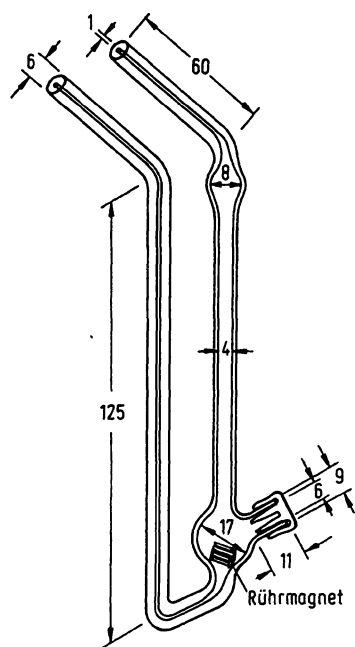


Abb. 1. Schematische Darstellung der Extraktionskammer. Maßangaben in mm. Der Abstand der Schenkel richtet sich nach dem Abstand der Ansatzstutzen des Gaseinlaßventils. In der Extraktionskammer befindet sich ein Rührmagnet.

merzieller Gaseinlaßventile von Gaschromatographen anstelle der Gasschleifen angeschraubt werden kann. (Solche Gaseinlaßventile ermöglichen, das Glasrohr mit Trägergas oder Spülgas zu durchströmen und nach außen hermetisch abzuschließen). Der aufsteigende Schenkel des U-Rohrs führt ohne Fritte in eine kugelförmige Erweiterung (Analysekammer) mit einem Ansatzstutzen, welcher ein Gummihütchen¹⁾ aufnehmen kann. Hier kann durch Einstich das Blut aus einer Spritze zugegeben werden. Analysekammer und Ansatzstutzen wurden von *Johns & Thompson* (6) übernommen. Eine zweite Erweiterung oberhalb der Analysekammer verhindert das Eindringen der Lösung in den Gaschromatographen.

Das Spülgas wurde aus dem Trägergasstrom vor Eintritt in den Gaschromatographen abgezweigt und über ein zweistufiges Gasreduzierventil auf 120 ml/min eingestellt. Die *gaschromatographische Meßanordnung* war konventionell und soll daher nur kurz angedeutet werden: Zwei parallele Kolonnensysteme, eine Referenzkolonne und ein Kolonnensystem zur Trennung von O₂, CO₂, N₂ und N₂O wurden mit Helium durchströmt. Das Trennsäulensystem bestand aus einer vorgeschalteten Trocknungssäule (Chromosorb P-NAW mit 40 % P₂O₄, Länge 20 cm), einer CO₂ absorbierenden Säule aus Natronkalk (Länge 18 cm) und einer Molekularsiebsäule (5 A, 45–60 mesh, Länge 430 cm) sowie einer 95 cm langen PAR 2-Säule (Polypak 2, Zusammensetzung: Styroldivinylbenzopolpolymer), die nach einem gemeinsamen O₂- und N₂-Peak CO₂ und N₂O trennte. Sie war der Natronkalksäule und der Molekularsiebsäule über T-Stücke parallel angeschlossen. Diese Säulenordnung wurde experimentell erarbeitet. Der Durchmesser der Säulen betrug 1/4 Zoll. Die Trocknungssäule bestand aus Nylon, die anderen Säulen aus Stahl. Das Durchströmungsverhältnis in den parallel geschalteten Säulen wurde über ein Nadelventil so eingestellt, daß die Banden der einzelnen Gase auf dem Gaschromatogramm getrennt waren. Die getrennten Gase wurden durch einen Wärmeleitfähigkeitsdetektor gemessen, dessen Ausgabe auf einem Kompensographen registriert wurde. Der Hewlett Packard Research Gaschromatograph 5750 wurde benutzt. Trägergasstrom: 63 ml/min. Ofentemperatur: 50 °C. Detektortemperatur: 100 °C. Brückenstrom: 200 mA.

¹⁾ Firma Beckman Instruments 94275

Die Überführung der Blutprobe. Es ist bekannt, daß 50–100 µl Blut aus dem hyperämisierten Ohrläppchen mit Hilfe von heparinisierten Glaskapillaren gewonnen werden können (7). Die mit 80 µl Blut gefüllten Glaskapillaren wurden auf Knetmasse mit einem Winkel von etwa 20° zur Horizontalen eingedrückt. Die Nadel einer geeichten 100 µl-HAMILTON-Spritze, deren Totraum mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllt war, wurde etwa 5 mm tief eingeführt. 60 µl Blut ließen sich dann leicht in das Spritzenlumen einsaugen. 50 µl Blut wurden in die Extraktionskammer injiziert. Der Totraum der Spritze wurde gemessen und bei der Auswertung des Gaschromatogramms berücksichtigt.

Die Gasextraktion. Zur Extraktion von O₂ und CO₂ aus der Blutprobe wurden vor der Injektion der Blutprobe 0,2 ml der von *van Slyke & Plazin* (8) angegebenen Ferricyanid-Saponin-Lactat-Lösung mit Antifoam in die Analysekammer gegeben. Die Kammer wurde 3 min mit Spülgas durchströmt und anschließend nach außen abgeschlossen. Nach Injektion der Blutprobe wurde der Kammerinhalt (Blut- und Extraktionslösung) 2 min mit einem Magnetrührer gemischt. Danach wurde die Extraktionskammer für 1 min an den Trägergasstrom angeschlossen.

Zur Reinigung der Kammern wurden nach Abnahme des Gummihütchens die Analysenreste abgesaugt, wiederholt dest. Wasser zugegeben und abgesaugt.

Auswertung des Gaschromatogramms. Als Maß für die Bandenfläche wurde das Produkt aus Bandenhöhe und -Halbwertsbreite bestimmt.

Zur Kalibrierung wurden nach Injektion und Spülung der Extraktionslösung mit einer geeichten HAMILTON-Spritze 20–100 µl Gas bekannter Zusammensetzung in die Analysekammer gegeben. Hierbei wurde der Spritzenkolben durch eine 5 mm lange Flüssigkeitssäule vor dem Spritzenkolben abgedichtet. Das weitere Vorgehen entsprach demjenigen nach Injektion einer Blutprobe (s.o.). Vor und nach einer Meßserie wurden je 2 Kalibrierungen durchgeführt. Der Mittelwert des Verhältnisses des injizierten Gasvolumens (STPD) und der Bandenfläche (Kalibrierfaktor) wurde für die einzelnen Gase bestimmt.

Ergebnisse

Der Blindwert. Wenn das Meßverfahren ohne Probenzugabe durchgeführt wurde, zeigte die Meßanordnung 0,035 µl O₂ an, was bei einer Probenmenge von 50 µl 0,07 Vol. % entspricht. Der Blindwert für O₂ wurde bei den folgenden Analysen berücksichtigt, indem dieser Wert vom Meßwert abgezogen wurde. Der Nullwert für O₂ wurde bei den folgenden Messungen nach vollständiger Oxygenierung analysiert.

Die Kalibrierkurve. Bandenfläche und injiziertes Gasvolumen waren bei den untersuchten Gasen einander proportional (Abb. 2). Der Variationskoeffizient des Meßwertes bei Injektion von 100 µl Gasproben betrug 0,32 % für O₂, 1,3 % für CO₂ und 0,5 % für N₂O.

Zur Prüfung der CO₂-Extraktion wurden die Konzentrationen von extrahierbarem CO₂ einer HCO₃⁻-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen gemessen. Die Extraktion war nach den Ergebnissen vollständig (s. Abb. 3a): Die Abweichung des Meßwertes von dem berechneten Wert war in dem Konzentrationsbereich zwischen 30 und 60 Vol. % nur ca. 1 %. Die Streuung um die Regressionsgerade betrug 0,5 Vol. %. Der *Variationskoeffizient* der CO₂-Meßwerte bei wiederholter Injektion der gleichen Lösung betrug 1,2 %.

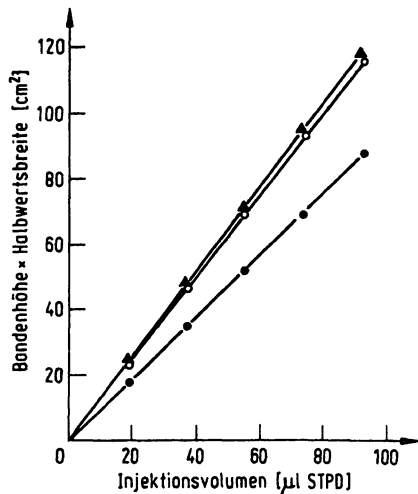


Abb. 2. Gas-Eichkurven für O_2 , CO_2 und N_2O . Das Produkt aus Höhe und Halbwertsbreite (Ordinate) als Maß der Bandenfläche ist gegen das injizierte Gasvolumen (STPD) (Abszisse) aufgetragen. Der Ordinatenabschnitt a , die Steigung b , die Streuung um die Regressionsgerade s_{yx} und der Korrelationskoeffizient r haben folgende Werte: Für CO_2 : $a = 0,16$; $b = 1,28$; $s_{yx} = 0,61$; $r = 0,999$. Für N_2O : $a = 0,19$; $b = 1,26$; $s_{yx} = 0,51$; $r = 0,999$. Für O_2 : $a = 0,06$; $b = 0,94$; $s_{yx} = 1,23$; $r = 0,999$. $\Delta = CO_2$; $\circ = N_2O$; $\bullet = O_2$.

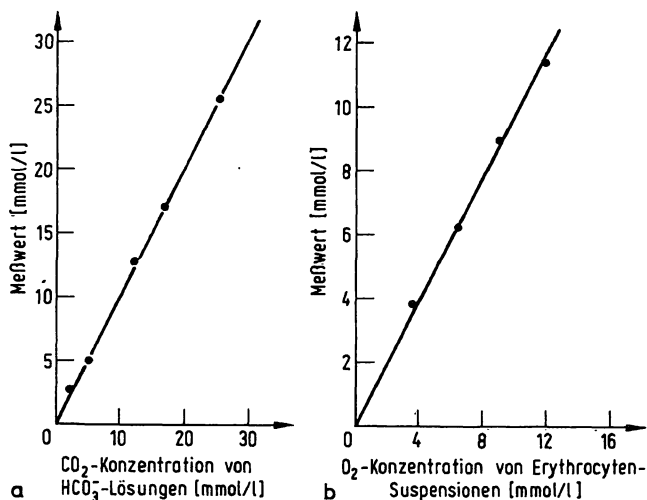


Abb. 3. Vergleich der gemessenen und berechneten Gaskonzentrationen.

Abb. 3a zeigt die *gemessenen* Konzentrationen des extrahierten CO_2 von HCO_3^- -Lösungen unterschiedlicher Konzentration (Ordinate) in Abhängigkeit von den *berechneten* CO_2 -Konzentrationen (Abszisse).

$$y = 0,05 + 1,01 x; s_{yx} = 0,49; s_{byx} = 0,004; r = 0,999.$$

Abb. 3b zeigt die gemessenen O_2 -Konzentrationen voll oxygenierter Erythrocytensuspensionen (Ordinate) in Abhängigkeit von den aus Hb-Konzentration und O_2 -Partialdruck *berechneten* O_2 -Konzentrationen (Abszisse).

$$y = 0,04 + 0,99 x; s_{yx} = 0,30; s_{byx} = 0,01; r = 0,999.$$

Zur Prüfung der O_2 -Extraktion wurden Erythrocytensuspensionen unterschiedlicher Hb-Konzentration nach vollständiger Oxygenierung mit O_2 analysiert. In Abbildung 3b sind die gemessenen O_2 -Konzentrationen gegen die

aus der Hb-Konzentration und der Hüfnerschen Zahl ($1,34 \text{ ml } O_2/\text{g Hb}$) unter Berücksichtigung der physikalischen Lösung berechneten O_2 -Konzentrationen aufgetragen. Die Hb-Konzentrationen wurden spektralphotometrisch bestimmt (9). Nach den Ergebnissen erfolgte eine quantitative Extraktion von O_2 aus den Erythrocytensuspensionen. Die Streuung der Regressionsgerade betrug 0,3 Vol. %. Der *Variationskoeffizient* der O_2 -Meßwerte bei wiederholter Injektion der gleichen Lösung war 1,3 %.

Zur Prüfung der N_2O -Extraktion wurde Blut mit einem Hämatokrit von 47 % analysiert, das mit H_2O -gesättigtem N_2O äquilibriert worden war. Aus den Messungen wurde die Löslichkeit α berechnet und mit den Werten der Literatur verglichen. Es ergab sich ein α von $0,426/\text{atm}$ ($s_x = 0,002/\text{atm}$) was mit dem von Kety et al. (10) angegebenen α ($0,418/\text{atm}$, interpoliert für einen Hämatokrit von 47 %) gut übereinstimmt. Der *Variationskoeffizient* der N_2O -Meßwerte bei wiederholter Injektion der gleichen Lösung betrug 1,3 %.

Zur Prüfung des Überföhrungsverfahrens von Blut aus dem Ohrldppchen wurden je 12 Blutproben aus einem Äquilibriumssystem einmal unmittelbar in eine HAMILTON-Spritze aufgesaugt und zum anderen zunächst in eine Glaskapillare eingefüllt und dann wie oben beschrieben in die HAMILTON-Spritze überföhrt. Bei der Injektion und Messung der Blutproben ergaben sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. Die prozentuale Differenz betrug 0,9 % ($s_d = 1 \%$).

Diskussion

Die vorliegende Extraktionskammer zeichnet sich durch einen geringen Blindwert aus, welcher die zuverlässige Analyse von $50 \mu\text{l}$ Blutproben erlaubt. Zur anaeroben Gewinnung dieser Blutproben sind nur etwa $60\text{--}80 \mu\text{l}$ Blut aus dem Ohrldppchen erforderlich. Der Variationskoeffizient von 1,3 % erscheint für biologische Messungen ausreichend klein. Die Streuung der Konzentrationswerte für O_2 und CO_2 ist bei unserem Verfahren in der Regel etwas größer als bei den von anderen Autoren beschriebenen gaschromatographischen Verfahren, bei denen allerdings meist wesentlich größere Probenmengen verwandt wurden (Tab. 1). Nur Davies (11) berichtet eine auch im Verhältnis zur Probenmenge wesentlich kleinere Streuung der Meßergebnisse.

Vergleich der gaschromatographischen Analyse mit der manometrischen Gasanalyse nach van Slyke & Plazin (8). Die gaschromatographische Analyse von O_2 und CO_2 erfordert nach unserem Verfahren etwa 6 min, die Auswertung 2–3 min. Sie hat damit einen kleineren Zeitbedarf als die Analyse mit dem manometrischen Apparat (8), welche in unserem Laboratorium etwa 10–12 min benötigt. Der Zeitbedarf der gaschromatographischen Analyse könnte durch Verwendung eines digitalen Integrators noch verringert werden.

Tab. 1. Gaschromatographische Verfahren zur Blutgasanalyse

Autor	(Jahr)	Methode	Probenmenge (μ l)	Variationskoeffizient (%)		
				O ₂	CO ₂	N ₂ O
Muysers et al.	(1961)	Vakuumentraktion	1000	1	1	—
Wilson et al.	(1961)	Auswaschverfahren	300	2	0,2	—
Hamilton	(1962)	Auswaschverfahren	100	—	1,5	—
Johns & Thompson	(1963)	Auswaschverfahren	100	1,0	1,0	—
Albers & Farhi	(1965)	Vakuumentraktion	500	0,7	—	—
Lenfant & Aucutt	(1966)	Auswaschverfahren	400	0,3	0,3	—
Ortega & Tammeling	(1968)	Auswaschverfahren	500	1,0	2,3	—
Davies	(1970)	Auswaschverfahren	80	0,5	0,5	0,4
Becker	(1970)	Auswaschverfahren	1000	1,9	0,8	—
Schachinger (diese Arbeit)		Auswaschverfahren	50	1,3	1,2	1,3

Der Variationskoeffizient der Messungen mit dem manometrischen Apparat (8) ist nach der Originalmitteilung 0,3 % für O₂ und CO₂. In der Routine treten jedoch nach unseren Erfahrungen 2–3 mal größere Variationskoeffizienten auf. Die Genauigkeit der gaschromatographischen Analyse und der manometrischen Analyse ist demnach nicht wesentlich verschieden.

Der tatsächliche Blutbedarf beträgt bei unserem gaschromatographischen Verfahren etwa die Hälfte von jenem bei der manometrischen Analyse.

Der entscheidende *Vorteil* der gaschromatographischen Blutgasanalyse ganz allgemein ist die leichte Messung der inerten Gase. Weiter erlaubt, worauf schon öfter hingewiesen wurde, die Messung der N₂-Konzentration den Nachweis einer Luftzumischung. Schließlich liegt in Form des Gaschromatogramms ein nachprüfbares Analysenprotokoll vor.

Der *Nachteil* der gaschromatographischen Analyse ist ihre Unspezifität. Die Blutgase müssen qualitativ vor der Messung bekannt sein, wenn eine exakte Analyse durchgeführt werden soll.

Literaturverzeichnis

- Muysers, K., Siehoff, F. & Worth, G., (1961). *Klin. Wochenschr.* 39, 83–87.
- Wilson, R. H., Jay, B., Doty, V., Pingree, H. & Higgins, E. *J. Appl. Physiol.* 16, 374–377, 1961.
- Albers, C. & Farhi, L. E. *Z. Ges. Exp. Med.* 139, 485–505, 1965.
- Van Slyke, D. D. & Neill, J. M. *J. Biol. Chem.* 61, 523–573, 1924.
- Thews, G. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 276, 89–98, 1962.
- Johns, T. & Thompson, B. *Analyzer* 4, 13–15, 1963.
- Siggaard-Andersen, O., (1965). *The acid-base status of the blood.* Copenhagen.
- Van Slyke, D. D. & Plazin, J., (1961). *Micromanometric analyses.* Baltimore.
- Kleihauer, E. & Betke, K. *Ärztl. Lab.* 3, 202–205, 1957.
- Kety, S. S. & Schmidt, D. F., (1948). *J. Clin. Invest.* 27, 476–483.
- Davies, D. D., (1970). *Brit. J. Anaesth.* 42, 19–31.
- Hamilton, L. H. & Kory, R. C., (1960). *J. Appl. Physiol.* 15, 829–837.
- Lenfant, C. & Aucutt, C., (1966). *Resp. Physiol.* 1, 389–407.
- Ortega, F. G. & Tammeling, G. J., (1968). *J. Appl. Physiol.* 24, 119–123.
- Becker, K., (1970). *Klin. Wochenschr.* 48, 464–467.

Dr. Harald Schachinger
Universitäts-Kinderklinik
1 Berlin 19
Heubnerweg 6